UNIVERSITÀ DI PISA
ISTITUTO DI PATOLOGIA VEGETALE
E DI MICROBIOLOGIA AGRARIA E TECNICA
OSSERVATORIO REGIONALE DI FITOPATOLOGIA

214

O. VERONA

L'assuefazione all'ambiente solforoso è tale da provocare un cambiamento di fase nel "lievito ellittico"?

Estratto dagli ANNALI DELLA FACOLTÀ DI AGRARIA
NUOVA SERIE - VOLUME VIII - (XLVI DALLA FONDAZIONE)
— 1947 —

ARTI GRAFICHE TORNAR - PISA

COMMONWEALTH MYCOLOGICAL INSTITUTE
24 AUG. 1948

UNIVERSITÀ DI PISA
ISTITUTO DI PATOLOGIA VEGETALE
E DI MICROBIOLOGIA AGRARIA E TECNICA
OSSERVATORIO REGIONALE DI FITOPATOLOGIA

214

O. VERONA

L'assuefazione all'ambiente solforoso è tale da provocare un cambiamento di fase nel "lievito ellittico"?

Estratto dagli ANNALI DELLA FACOLTÀ DI AGRARIA
NUOVA SERIE - VOLUME VIII - (XLVI DALLA FONDAZIONE)
— 1947 —

ARTI GRAFICHE TORNAR - PISA

RIASSUNTO - L'A. studia le variazioni di fase in *Sacch. ellipsoideus* nei loro aspetti tecnologicamente più importanti e specie in rapporto al processo di vinificazione in ambiente solfitato.

È noto nell'industria enologica come alcuni trattamenti sterilizzanti (pastorizzazione, filtrazione, centrifugazione, ecc.) valgano a favorire nei mosti l'azione dei fermenti selezionati. Fra questi trattamenti il più comune, per la sua semplicità d'impiego, è rappresentato dalla solforazione o solfitazione.

Naturalmente, questa pratica è messa in rapporto alla possibilità di rendere inattivi i così detti lieviti selvaggi e, per contro, alla possibilità che l'ellittico, nel singolare ambiente solforato o solfitato, possa moltiplicarsi e mantenersi attivo.

Al fine di rendere più sicura la sua azione la pratica, anzi, suggerisce di fare impiego (ove ciò si trovi opportuno) di lieviti non solo selezionati, ma anche previamente adattati all'ambiente solforoso.

Vero è che tra l'impiego di lieviti semplicemente selezionati e lieviti selezionati ed adattati non tutti trovano differenze di rilievo e molti (MARTINAND, DE' ROSSI, MENSIO) anzi mettono in dubbio che si determini una vera e propria assuefazione limitatamente, almeno, ai cosidetti metodi rapidi di adattamento quali vengono suggeriti per la pratica. In questo senso, riprendendo idee già espresse da DE' ROSSI, si esprime anche GIOVANNOZZI ([1]).

Ad ogni modo, si determini o meno tale assuefazione, ci è parso di un qualche interesse stabilire se, portato a vivere in ambiente solforoso, il lievito

---

(1) - M. GIOVANNOZZI - *L'adattamento dei lieviti all'ambiente solforoso.* - Ann. di Tecn. Agrar., anno IV, pag. 291, 1925.

ellittico vada incontro ad una variazione di fase e in che modo, nel caso, tale variazione si manifesti avuto riguardo ai caratteri sia biologici che tecnologici della specie. Poichè, senza qui riportare quanto è già noto in materia di variazione nei lieviti, sappiamo come sotto un qualsiasi stimolo essi subiscano, parimenti alle altre specie microbiche (meglio studiate sotto questo punto di vista), variazioni più o meno complesse e non sempre tecnologicamente utili. La fase « R » è infatti data, almeno nella maggior parte dei casi, come la fase biologicamente e biochimicamente meno attiva.

* * *

Le esperienze sono state condotte su due ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* (HANSEN) DEKKER (= *Sacch. ellipsoideus* HANSEN) isolati da mosti locali.

Al momento dell'isolamento i due ceppi presentavano i caratteri tipici della specie in fase « S ». Coltivati in agar-malto tali caratteri si mantennero invariati per tutta la durata delle esperienze.

Parallelamente alla fase « S » fu saggiato il comportamento di fase dei due ceppi in ambiente più o meno solfitato studiandosene, in conseguenza, le differenze secondo quanto in appresso è sommariamente riferito.

Si deve premettere che l'adattamento al mezzo solfitato si è tentato di raggiungerlo a seguito di passaggi periodici sia in agar-malto che in malto non agarizzato contenenti quantità di metabisolfito di potassio pari allo 0,1-0,2-0,5 ‰. I passaggi venivano normalmente eseguiti al 10° giorno, allorquando le colture erano ben sviluppate nell'ordine seguente:

	mezzo normale (controllo)	metabisolfito 0,1 ‰	metabisolfito 0,2 ‰	metabisolfito 0,5 ‰
1ª semina	0	0		
	↓	↓		
1° trapianto	0	0		
	↓	↓		
2° trapianto	0	0	0	
	↓	↓	↓	
3° trapianto	0	0	0	
	↓	↓	↓	
4° trapianto	0	0	0	0
	↓	↓	↓	↓
5° trapianto	0	0	0	0
	↓	↓	↓	↓
ecc.	ecc.	ecc.	ecc.	ecc.

In tal caso è stato possibile ottenere ceppi ad un diverso grado di dissociazione massimo, naturalmente, in presenza di metabisolfito 0,5 $^0/_{00}$.

È a dirsi subito come nessuna sensibile differenza di comportamento si sia registrata fra i due ceppi di ellittico in esperimento. Diversa è sembrata invece l'influenza della natura del substrato poichè in malto liquido la presenza del sale è stata sentita più che in malto agarizzato.

Si deve ancora aggiungere che, agli effetti della variazione di fase, la presenza di metabisolfito allo 0,1 $^0/_{00}$ si fa sentire tardivamente mentre più pronta ed evidente appare la reazione allorquando il sale sia contenuto in quantità maggiori: in ogni caso *la comparsa dei fenomeni di variazione si manifesta dopo un più o meno lungo numero di passaggi.*

Ad ogni modo, qualora si insista nel coltivare l'ellittico in mezzi contenenti più forti dosi di metabisolfito, l'apparizione della fase « R » risulta evidente e si palesa attraverso i seguenti caratteri differenziali:

	Ceppo in fase « S »	Ceppo in fase « R »
forma e dimensioni:	- normali	- tendenza più o meno evidente alla forma allungata con rara comparsa nelle vecchie colture o nelle colture liquide di abbozzi pseudo-miceliari; - dimensioni conseguentemente maggiori.
sporificazione:	- normale	- maggiore facilità di sporificazione; non variazioni nella forma degli aschi e nel numero e forma delle spore.
caratteri degli strisci:	- patina liscia, omogenea	- patina più o meno rugosa e comparsa di colonie secondarie.
caratteri delle colture liquide:	- normali	- tendenza, anche se non sempre molto evidente, alla formazione di veli.
caratteri delle colonie giganti:	difficilmente discriminabili giacchè, anche in fase « S » le colonie giganti si presentano variamente strutturate. La fase « R » presenta, tuttavia, comparativamente osservata, una maggiore strutturazione.	
velocità di sviluppo:	- normale	- più lenta che in fase « S » (1).

(1) - Solo in presenza di piccole quantità di sale si ebbe talvolta stimolo e, quindi, accelerazione di sviluppo.

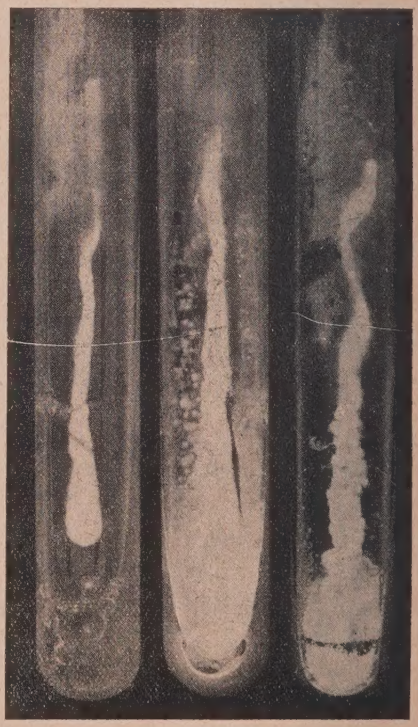
agglutinazione aspecifica alla tripaflavina:	- non agglutinazione o molto lenta agglutinazione	- agglutinazione più o meno rapida.
attività fermentativa:	- normale	- più lenta sia nei riguardi della fermentazione del glucosio che della inversione del saccarosio; conseguentemente più lenta, in questo caso, la fermentazione dell'invertito.
resistenza agli antisettici:	- in agar-malto e, più evidentemente, in malto, sviluppo anche in presenza dell'1 ‰ di ac. fenico	- in agar-malto e in malto sviluppo stentato o nullo in presenza dell'1 ‰ di ac. fenico.

Stabilito: 1) che nel lievito ellittico non insorgono, in ambiente moderatamente solfitato, fenomeni dissociativi al primo o secondo passaggio;

2) che tali fenomeni appaiono però evidenti dopo più numerosi passaggi specie allorquando il mezzo contenga più forti dosi di metabisolfito;

3) che essi fenomeni sono accompagnati da un insieme di caratteri morfologici, colturali, biochimici, propri delle forme variate; si è voluto più estesamente indagare l'attività delle due fasi in rapporto alla fermentazione sia del glucosio che del mosto, presente o non presente metabisolfito potassico.

All'uopo, in una prima ricerca (limitata, come la successiva, ad un solo ceppo) è stata determinata l'anidride carbonica capace di svolgersi, in un certo intervallo di tempo, da una soluzione di glucosio e precisamente nel liquido



Ceppo di lievito ellittico in fase normale (a sinistra) e in fase variata (in centro e a destra).

di WILLSTÄTTER e STEIBELT (1) addizionato o meno del 0,3 ‰ di metabisolfito di potassio. La semina, come richiede il metodo, fu massiva e quindi effettuata inoculando nei recipienti di coltura (previamente sterilizzati a vapore fluente) cc. 1 dello stemperamento in acqua sterile di dense patine colturali sviluppate su agar-malto. I matracci, appena insemensati, furono posti in termostato a 25° C. e messi in collegamento con un dispositivo simile a quello usato da EULER SAHLIN (2) e da altri per la misurazione dell'anidride carbonica. Le letture furono effettuate durante le prime quattro ore, tempo ritenuto sufficiente ad osservare eventuali differenze, essendo noto come la maggior produzione di gas si compia nelle prime tre-quattro ore. Fu ottenuto:

cc. di CO_2 dopo ore:	liquido di WILLSTÄTTER e STEIFELT		id. più lo 0,3 ‰ di metabisolfito di potassio	
	inoculato con un ceppo in fase » S »	inoculato con lo stesso ceppo in fase « R »	inoculato con un ceppo in fase « S »	inoculato con lo stesso ceppo in fase « R »
1	32,4	28,5	10,5	9,4
2	43,7	40,2	14,8	12,1
3	46,1	43,6	40,2	38,6
4	42,5	41,1	46,6	44,5
Totale	164 7	153,4	112,1	104,6

Due fatti, fondamentalmente, sono emersi:

1) la presenza di metabisolfito ritarda il manifestarsi del processo:

2) il ceppo in fase « R » si dimostra meno attivo di quello in fase « R ».

---

(1) - WILLSTAETTER e STEIBELT: *Z. Physiol Ch.*, vol. 115, p. 211, 1921.

[Si mescolano a parti uguali una soluzione di glucosio al 10 % e un'altra contenente in 100 p., gr. 2,5 di KH_2PO_4, gr. 2 di CH_3CONH_2, gr. 0,25 di $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, gr. 0,10 di $CaSO_4 \cdot 2H_2O$. Entrambe le soluzioni si saturano previamente di CO_2 a 25° C.].

(2) - EULER e SAHLIN - *Z. Gärungphysiol.* Vol. 3, 1931.

[Il matraccio di coltura è chiuso con un tappo di gomma attraversato da due tubi di vetro: uno di questi, munito di robinetto, comunica con l'esterno; l'altro, piegato a squadra, è collegato con una buretta graduata, aperta alla base e posta entro un tubo pieno di acqua. L'acqua della quale si riempie la buretta e il tubo viene saturata di NaCl e CO_2 a temperatura ambiente. All'inizio dell'esperienza si porta a zero il livello dell'acqua nella buretta. Svolgendosi gas, il livello si abbassa e viene letto portando a coincidere con esso il livello del liquido situato nel tubo di protezione della buretta].

* * *

In una seconda serie di ricerche fu operato in modo diverso. Fu allestita, cioè, una batteria di matracci muniti di valvola ad acido solforico e contenenti ciascuno 50 cc. di mosto sterile in parte addizionato di metabisolfito di potassio in quantità del 0,3 ‰. Fu usato mosto concentrato, diluito fino ad avere una quantità in zuccheri riduttori del 24 % circa (esattamente 24,17 %). Ad indice dell'attività fermentativa venne preso il valore della CO_2 sviluppatasi e dedotto gravimetricamente pesando, giorno per giorno, i recipienti di coltura. Le semine furono effettuate inoculando uguali quantità di uno stemperamento, in acqua sterile, di patine sviluppate in agar-malto, operando con lo stesso ceppo in fase « S » ed uno in fase « R ». Durante tutto il corso dell'esperienza i matracci furono mantenuti a temperatura di 25° C. Risultò:

dopo giorni:	grammi di CO_2 sviluppata da 100 cc. di mosto			
	mosto *non* addizionato di metabisolfito		mosto con lo 0,3 ‰ di metabisolfito	
	ceppo in fase « S »	ceppo in fase « R »	ceppo in fase « S »	ceppo in fase « R »
1	1,020	0,221	0,505	0,081
2	1,979	0,705	1,420	0,434
3	3,655	1,254	2,491	0,980
4	5,004	2,627	4,102	1,758
5	6,380	4,251	5,815	3,420
6	7,436	5,605	7,250	5,516
7	8,502	6,810	8,314	7,064
8	8,988	7,833	9,108	8,321
9	9,379	8,510	9,610	9,007
10	10,006	9,007	10,104	9,593
11	10,197	9,515	10,470	10,036
12	10,242	9,721	10,602	10,480
13	10,306	10,050	10,674	10,678
14	10,411	10,104	10,726	10,704
15	10,582	10,121	10,781	10.766

I dati tratti da questa seconda esperienza confermano, in fondo, quanto emerse dalla prima che, cioè, la presenza di metabisolfito ritarda il processo fermentativo e che il ceppo in fase « R » si dimostra meno attivo.

Ebbene, tutto ciò consente di concludere:

1) Il lievito ellittico portato a vivere in ambiente solfitato tende a passare dalla fase « S » (normale) alla fase « R » (variata).

2) Tale passaggio si determina, tuttavia, almeno nei ceppi sperimentati, a seguito di una prolungata e ripetuta permanenza in mezzo solfitato e in modo relativamente più o meno veloce in relazione alla quantità di sale presente nello stesso mezzo.

3) Il cambiamento di fase è progressivo; quando la fase « R » appaia dichiarata essa si manifesta con caratteri morfologici, colturali, fisiologici propri, conforme quanto in linea generale è già noto. Cioè, comparsa di colonie rugose eventualmente accompagnate da colonie secondarie, più pronta agglutinazione alla tripaflavina, tendenza a formazioni miceliari e, nei mezzi liquidi, a formazione di veli, attenuazione del potere fermentativo.

4) Tecnologicamente l'uso dei cosidetti fermenti adattati all'ambiente solforoso (qualora tale adattamento si verifichi, ciò che appare assai dubbio qualora si applichino i così detti metodi rapidi) può non essere conveniente, comunque da controllarsi di volta in volta, potendosi determinare un cambiamento di fase al quale fa riscontro una attenuazione del potere fermentativo.

5) Siccome, in relazione a quanto fissato in 2) il cambiamento di fase non si determina che a seguito di più passaggi, l'uso dell'anidride solforosa o dei suoi sali non è tale, nel processo di vinificazione, da indurre durante il corso del processo variazioni sensibili nell'ellittico e quindi incidere sul rendimento finale del medesimo.

Praticamente: ove si proceda alla vinificazione in ambiente solforato o solfitato, è consigliabile di innestare un buon lievito a parte propagato in semplice mosto. Questo perchè, mentre il metabisolfito o altro sale presente nel mosto non è tale da indurre subito variazioni sensibili, una propagazione in tal mezzo può, specie se ripetuta (a parte la discussa assuefazione), determinare una qualche variazione o avviare il lievito verso fenomeni dissociativi capaci poi di esplodere nel corso della vinificazione.

Qualora, infine, si faccia uso di lieviti selezionati del commercio sarà necessario, preliminarmente, controllare il loro stato di fase. Tale controllo deve essere opera delle Case produttrici [1].

(1) - Cade opportuno aggiungere che l'esame colturale delle patine su agar in rapporto al noto carattere di rugosità non sempre si dimostra sufficiente. Infatti il ceppo può trovarsi in via di variazione o anche presentare, dal punto di vista fermentativo, i caratteri dei ceppi variati senza che le colture su agar si dimostrino rugose. Non sempre poi, le colture, vengono propagate su agar e non sempre quindi si può far ricorso al carattere della rugosità; anche in commercio si trovano, il più delle volte, in mezzo liquido.

Vale allora il saggio di agglutinazione aspecifica alla tripaflavina. Esso si eseguisce come segue: si prende un piccolo tubo di vetro e vi si versa una soluzione di tripaflavina allo 1 ‰. Vi si stempera quindi una piccola massa di lievito. Ove questo si trovi in fase «R» o tenda verso questa fase, la sospensione non rimane omogeneamente torba, ma, più o meno rapidamente, si fa fioccosa, nubecolare, depositandosi al fondo del tubo.